

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Martin Benda

Regulace bakteriální transkripce alternativními faktory sigma

Regulation of bacterial transcription by alternative sigma factors

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2014

Poděkování: Rád bych poděkoval Mgr. Liboru Krásnému, Ph.D. za trpělivé vedení bakalářské práce, cenné rady a ochotu se zabývat vzniklými problémy. Dále děkuji ostatním členům Laboratoře molekulární genetiky bakterií za rady a podněty a také trpělivé přítelkyni a rodičům za pomoc s odstraněním gramatických chyb.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 5. 2014

Martin Benda

Abstrakt

Důležitou vlastností bakterií je jejich schopnost reagovat na rozličné životní podmínky pomocí regulace na úrovni transkripce. Tato práce je zaměřena na regulaci iniciace transkripce pomocí využití různých faktorů sigma. Faktory sigma jsou specifické podjednotky RNA polymerázy, které zajišťují její správné nasednutí na promotorovou oblast genu či operonu. Při exponenciální fázi růstu v ideálních podmínkách buňka přepisuje většinu genů pod kontrolou tzv. *housekeeping* faktoru. Při přechodu do stacionární fáze, sporulaci či při odpovědi na stresové podmínky jsou však přepisovány geny pod kontrolou alternativních faktorů. Tato práce přináší výčet těchto alternativních faktorů u *Bacillus subtilis*, zaměřuje se na podmínky, při nichž jsou jednotlivé faktory sigma využívány, metody aktivace a represe aktivity těchto faktorů a jimi kontrolované regulony.

Klíčová slova: RNA polymeráza, alternativní faktor sigma, transkripce, genová exprese, *Bacillus subtilis*

Abstract

An important feature of bacteria is their ability to respond to various environmental conditions by regulation of transcription. This thesis is focused on regulation of transcription initiation by different sigma factors. Sigma factor is a specific subunit of RNA polymerase, which ensures correct recognition of promotor sequences. During exponential growth phase under ideal conditions, the cell transcribes most of the genes under the control of the so-called *housekeeping* sigma factor. In the transition to stationary phase, during sporulation or upon exposure to different stresses, many genes are activated and transcribed under the control of alternative sigma factors. This work presents a list of these alternative sigma factors of *Bacillus subtilis*, focusing on conditions under which the individual sigma factor is used, methods of activation and repression of these factors and on regulons controlled by these sigma factors.

Key words: RNA polymerase, alternative sigma factor, transcription, gene expression, *Bacillus subtilis*

Seznam použitých zkratk:

AMK – aminokyselina

ATP – adenosintrifosfát

c-di-AMP – cyklický diadenosinmonofosfát

DNA – deoxyribonukleová kyseliny

ECF – faktory s extracytoplasmatickou funkcí

EM – extracelulární matrix

FM – frekvenční modulace

GSP – generální stresový protein

iNTP – iniciační nukleosidtrifosfát

NTP – nukleosidtrifosfát

PG – peptidoglykan

RNA – ribonukleová kyselina

RNAP – RNA polymeráza

Rsb – regulátor sigmy B

Wt – “divoký kmen“

Obsah

1	Úvod	1
2	Regulace aktivity faktorů sigma	1
3	σ^{54}	2
3.1	Sigma L.....	3
4	σ^{70}	3
4.1	Sigma A	5
4.2	Sigma B	6
4.3	Sigma D	9
4.4	Sigma I.....	10
4.5	Sigma H	11
4.6	Sporulační faktory	12
4.6.1	Sigma F	13
4.6.2	Sigma E	13
4.6.3	Sigma G.....	14
4.6.4	Sigma K.....	15
4.7	ECF faktory.....	16
4.7.1	Sigma M.....	17
4.7.2	Sigma X.....	18
4.7.3	Sigma W.....	19
4.7.4	Sigma V.....	20
4.7.5	Sigma Y.....	21
4.7.6	Sigma Z	21
4.7.7	YlaC	21
4.8	YvrI-YvrHa.....	22
5	Závěr	23
6	Použitá literatura.....	24

1 Úvod

Regulace genové exprese probíhá nejčastěji pomocí regulace transkripční iniciace. Samotnou transkripci zajišťuje RNA polymeráza. Bakteriální RNA polymeráza se skládá z dimeru podjednotek α a podjednotek β , β' a ω , které dohromady tvoří tzv. jádro RNA polymerázy. K tomuto jádru se při iniciaci transkripce připojuje podjednotka (faktor) σ , která má zároveň klíčovou roli v regulaci transkripční iniciace, jelikož faktor sigma rozeznává promotorovou oblast v DNA.

Bakteriální promotor se skládá ze dvou vysoce konzervovaných oblastí. První je oblast -10 (někdy také nazývaná Pribnow box po jejím objeviteli), druhou oblastí je -35, která může být u některých promotorů zanedbána. Dále existují oblasti důležité pro rozpoznání některých specifických promotorů, například tzv. diskriminátor, což je oblast nacházející se mezi pozicemi -10 a +1, nebo tzv. extended -10 oblast nacházející se *upstream* od -10 oblasti.

Většina genů je transkribována jedním hlavním faktorem sigma tzv. *housekeeping* sigma (u *E. coli* σ^{70} , u *B. subtilis* σ^A); alternativní faktory sigma jsou používány pro transkripci genů při různých stresových odpovědích. Správné navázání faktoru sigma je nutné pro iniciaci transkripce, která může být regulována i dalšími regulačními molekulami, jako třeba ppGpp či proteinem DksA.

Počet alternativních faktorů sigma se u jednotlivých druhů bakterií výrazně liší. Existují bakterie, které mají pouze jeden (*Mycoplasma genitalium*), naopak některé jich mají až 60 (*Streptomyces coelicor*). Tradiční modelový organismus *Escherichia coli* jich má 7, *Bacillus subtilis* 18. Právě faktory sigma u *B. subtilis* se budu v další části této práce zabývat konkrétněji a pokusím se na nich demonstrovat strategie pro přežití této bakterie v rozdílných podmínkách.

Faktory sigma můžeme rozdělit do 2 základních skupin, σ^{70} a σ^{54} . Faktory σ^{54} jsou v menšině a zahajují transkripci ze značně odlišných promotorů, které popíši podrobněji v jim věnované kapitole.

2 Regulace aktivity faktorů sigma

Regulace exprese genů pod kontrolou jednotlivých faktorů sigma je zajišťována vazbou faktoru sigma na anti-sigma protein. Typickým příkladem je aktivace σ^E u *Escherichia coli*. Ta je za normálních okolností blokována anti-sigmou RseA, která je membránově vázaná. Pokud dojde ke špatnému sbalení beta skládaných listů, tak je

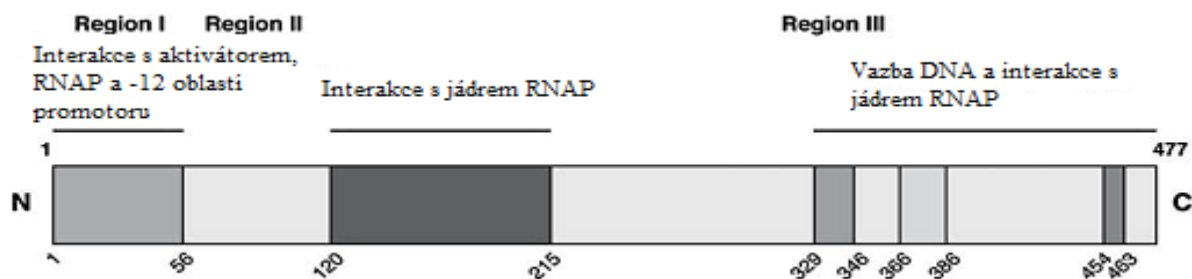
anti-sigma štěpena v místě 1 proteázou DegS (Ades *et al.*, 1999); k takto naštěpenému RseA má afinitu RseP, který ho štěpí v místě 2 (Kanehara *et al.*, 2002), to vede k uvolnění N konce z membrány a anti-sigma je následně cytosolickými proteázami plně degradována (Chaba *et al.*, 2007). Tím je uvolněna σ^E a je možno odpovědět na buněčný stres a opravit sbalování beta skládaných listů. Podobným mechanismem sestřihu faktorů anti-sigma jsou regulovány především extracytoplasmatické (ECF) faktory sigma. U *B. subtilis* je například dobře popsána regulace ECF faktoru σ^W , kterou podrobněji popíši v kapitole věnované tomuto faktoru sigma.

Kromě této regulace může být anti-sigma také vyvazována tzv. anti-anti-sigmou a tím spouštět aktivitu transkripčního faktoru. Faktor sigma se také může nacházet ve formě Pro-sigmy, která je poté štěpena a tím aktivována, což bude dále popsáno u faktorů σ^E a σ^K . U *Escherichia coli* existují i další metody regulace faktorů sigma, například σ^S je označena a následně degradována a tím je snižováno její zastoupení (Zhou *et al.*, 2001).

3 σ^{54}

Faktory z rodiny σ^{54} , jsou sekvenčně se σ^{70} zcela nehomologní a pro svoji aktivitu vyžadují aktivátor a ATP, které je aktivátorem využíváno. Zástupce této rodiny σ^{54} nebývá přítomen v organismu více než jeden (v *B. subtilis* do této skupina spadá pouze faktor σ^L). Sigma 54 se liší od sigmy 70 polohou konzervovaných sekvencí rozpoznávaných promotorů, které má na pozicích -12 a -24 (Morett & Buck, 1989).

Jak je vidět na obrázku 1, σ^{54} se skládá ze 3 regionů. Region I zajišťuje kontakt s oblastí -12 promotoru a také s jádrem RNAP, zatímco II pouze spojuje regiony I a III, někdy interaguje s RNAP, ale v určitých případech může i chybět. Region III zajišťuje kontakt s jádrem RNAP i s promotorovými sekvencemi (Bose *et al.*, 2008). Připojení aktivátoru mění konformaci regionu I, který je poté schopen vázat se na DNA.



Obrázek 1: Schematická struktura jednotlivých funkčních částí σ^{54} . Upraveno z (Bose *et al.*, 2008).

3.1 Sigma L

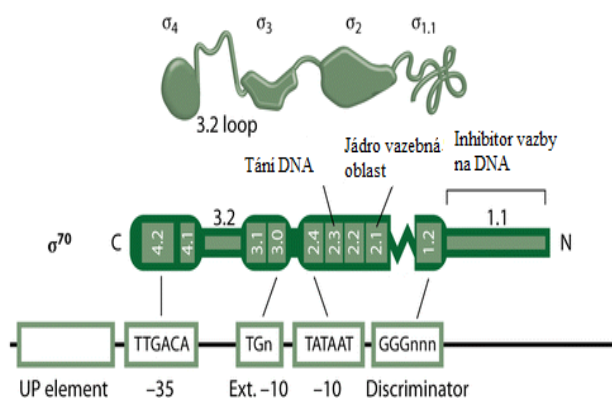
Sigma L je jediným zástupcem rodiny faktorů σ^{54} u *Bacillus subtilis* (Débarbouillé *et al.*, 1991). Pod jeho kontrolou je několik genů rozdílných funkcí, jednou z nich je adaptace na náhlé snížení teploty (z 37°C na 15°C) (Wiegeshoff *et al.*, 2006). Dále do regulonu sigmy L patří geny pro metabolismus fruktózy a levananu (Martin-Verstraete *et al.*, 1995), argininu (Gardan *et al.*, 1997), valinu, leucinu a isoleucinu (Débarbouillé *et al.*, 1999) a pro acetoin dehydrogenázový komplex (Ali *et al.*, 2001). Přepis genu *sigL* je regulován katabolickým represorem CcpA, který reaguje na zvýšenou hladinu glukózy či jiných zdrojů uhlíku. CcpA se váže do tzv. CRE místa uprostřed *sigL* genu a tím zabraňuje jeho transkripci. (Choi & Saier, 2005).

4 σ^{70}

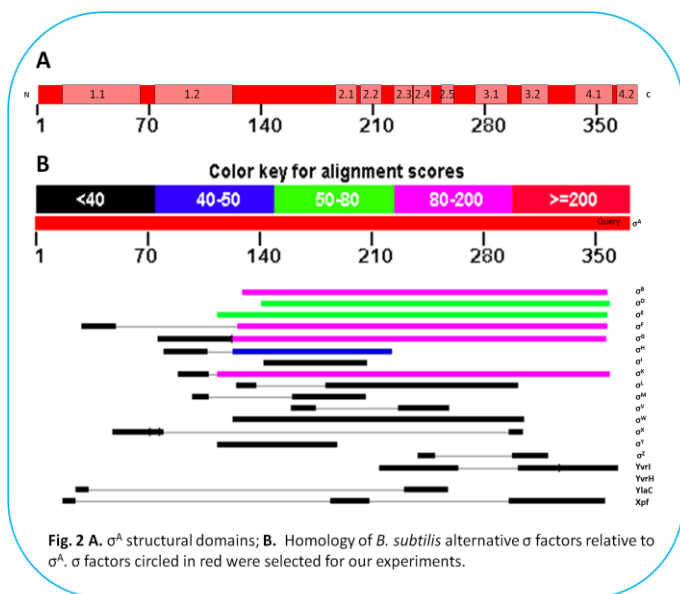
Většina bakteriálních faktorů sigma ovšem patří do skupiny pojmenované po faktoru *E. coli* σ^{70} . Faktory z rodiny σ^{70} interagují s promotorovou oblastí na 4 místech. Další méně specifické interakce RNAP s promotorem mohou ovšem zajišťovat i ostatní podjednotky.

σ^{70} se skládá ze 4 domén (viz Obrázek 2), které mají při vazbě na promotor rozdílné funkce. Region 1.1 je specifický pro skupinu *housekeeping* faktorů a má autoinhibiční funkci, která brání faktoru sigma v nasedání na DNA v nepřítomnosti jádra RNAP. Oblast 1.2 může u některých promotorů reagovat s diskriminátorem (Haugen *et al.*, 2008). Doména 2 zajišťuje za první vazbu na β' podjednotku jádra RNAP pomocí 2.1 oblasti, což je hlavní vazba faktoru sigma na jádro RNAP, a za druhé vazbu na -10 oblast promotoru pomocí 2.4 oblasti. Na oblast -35 promotoru se faktor sigma váže 4.2 oblastí. Doména 3 může u některých promotorů postrádajících oblast -35 zajišťovat vazbu do tzv. extended -10 oblasti. Regiony 3 a 4.1 také interagují s β podjednotkou jádra RNAP, i když tato interakce není tak silná jako interakce mezi 2.1 oblastí a β' podjednotkou. Tyto proteinové interakce nejsou stálé

a v průběhu iniciace se podjednotky jádra RNAP a faktor sigma vůči sobě pohybují (Gruber *et al.*, 2001).



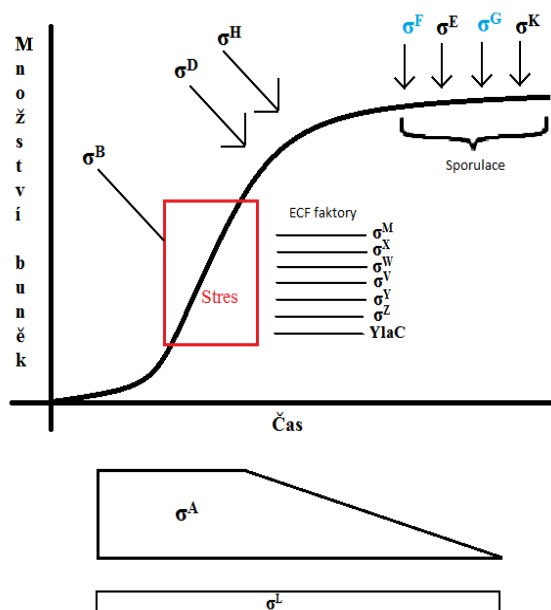
Obrázek 2: Schematická struktura faktorů sigma z rodiny σ^{70} a interakce jednotlivých regionů s promotorovou DNA. Upraveno z (Österberg *et al.*, 2011)



Obrázek 3: Srovnání sekvencí jednotlivých faktorů u *B. subtilis*. Převzato od O. Ramaniuk, dosud nepublikovaná práce

Podskupina 3 má také všechny 3 globulární domény (2,3,4), ale její AMK sekvence je již od podskupiny 1 vzdálenější. Faktory spadající do této skupiny ovládají regulony zodpovědné za rezistenci k teplotnímu šoku, sporulaci či syntézu bičíku a pohyblivost.

Nejrozdílnější od podskupiny 1 je podskupina 4, do které patří faktory s extracytoplasmatickou funkcí (ECF). Tyto faktory reagují na stresy vyvolané změnou okolního prostředí. Obsahují pouze domény 2 a 4 (sekvenční homologie viz Obrázek 3), které jsou nutné pro rozpoznání promotoru a jsou kódovány v operonu spolu s jejich anti-sigmou.

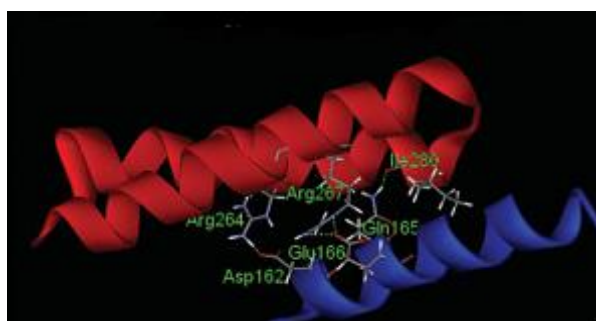


Na následujících stránkách popíšeme klíčové informace o jednotlivých faktorech této skupiny u *B. subtilis*; o jejich funkcích, regulonech, regulacích aktivity či použití při rozdílných životních fázích (viz Obrázek 4).

Obrázek 4: Použití jednotlivých faktorů sigma při různých fázích životního cyklu. Modře označené sporulační faktory jsou používány pouze v nově utvářené spoře, zatímco černě označené jsou používány v mateřské buňce. Na obrázku chybí dva faktory, konkrétně σ^I a YvrI , jelikož jejich malé regulony obsahují geny odlišných funkcí a nebylo tedy možno je do tohoto schématu zařadit.

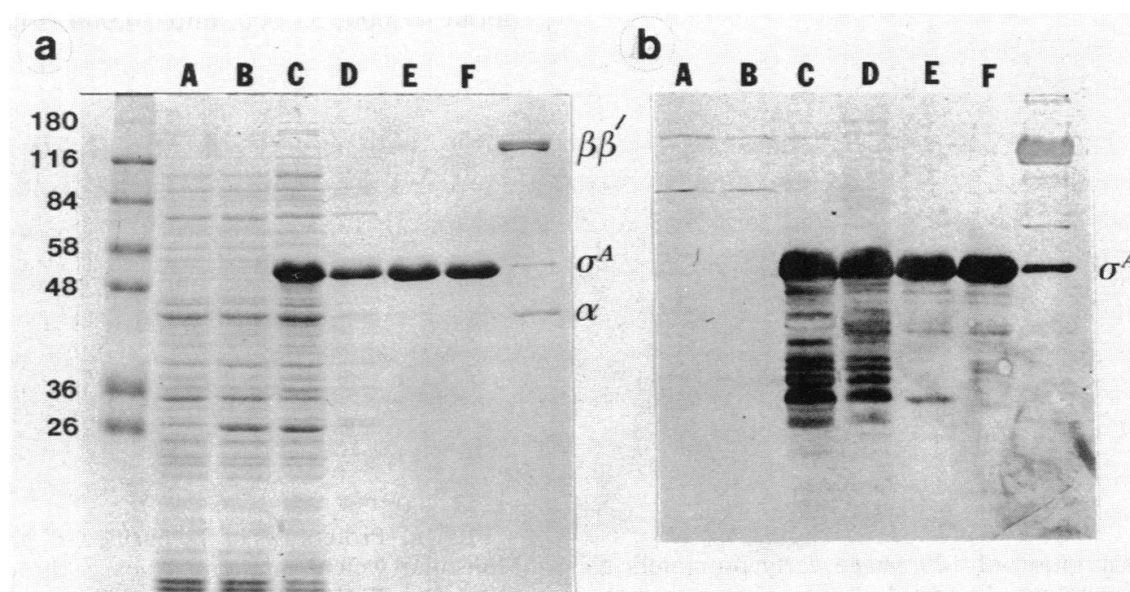
4.1 Sigma A

Faktor sigma A má u *B. subtilis* roli *housekeeping* faktoru a pod jeho kontrolou jsou přepisovány geny při vegetativním růstu. Dle databáze Dbtbs (<http://dbtbs.hgc.jp/>) se podílí na transkripci více než 350 operonů. Hlavní interakce σ^A podjednotky s β' podjednotkou jsou zajišťovány regionem 2.2. Vazbu zajišťují slabé interakce, jako jsou vodíkové vazby nebo hydrofobní interakce (viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Vodíkové vazby mezi σ podjednotkou (modrá) a β' podjednotkou (červená). Upraveno z (Johnston et al., 2009)

Ačkoliv faktor σ^A patří do skupiny σ^{70} , na rozdíl od tohoto faktoru *E. coli* není jeho molekulová hmotnost 70 kDa, ale pouze 43 kDa. Na SDS-Page gelu ovšem putuje, jako kdyby měl 55 kDa (Chang & Doi, 1990) (viz Obrázek 6).



Obrázek 6: SDS-PAGE gel ukazující σ^A protein (a) a Western blotová analýza (b). Převzato z (Chang & Doi, 1990)

Důležitým mechanismem regulace iniciace transkripce ze σ^A dependentních promotorů je regulace pomocí koncentrace iniciačního nukleosidtrifosfátu (iNTP), což je takový NTP který má být zařazen na pozici +1 vznikající mRNA. Vysoká koncentrace NTP, stabilizuje komplex RNA polymerázy s DNA, ve které je vytvořena transkripční bublina (Krásný & Gourse, 2004). Zvyšováním či snižováním této koncentrace tedy může ovlivnit míru transkripce daného genu.

4.2 Sigma B

Alternativní faktor σ^B se podílí na transkripci tzv. generálních stresových proteinů (GSP). Tyto proteiny jsou zodpovědné za nescifickou odpověď na stresové podmínky, vyvolané různými podněty. Díky tomu je regulon σ^B nazýván „general stress regulon“. Faktor σ^B je zodpovědný za expresi GSP v reakci na etanol, butanol, osmotický a oxidativní stres, nízké i vysoké teploty či nedostatek kyslíku a glukózy. Taktéž se aktivuje v reakci na antibiotika vankomycin a bacitracin, modré světlo a pokles hladiny ATP.

Ne všechny podmínky však indukují expresi ze σ^B dependentního promotoru stejně. Když byla porovnána síla exprese daných genů v jednotlivých podmínkách, bylo zjištěno, že butanol, osmotický stres a zvýšení teploty indukují daleko silněji přepis ze σ^B dependentních promotorů než u ostatních stresových podmínek. Naopak nejhůře expresi GSP indukuje oxidativní stres (Nannapaneni *et al.*, 2012). Ochrana proti němu je spíše pouze druhotnou ochranou vyvolanou původně jiným druhem stimulů (Reder *et al.*, 2012a). Celkově bylo v poslední studii nalezeno 166 genů, které jsou jednoznačně transkribovány za pomoci RNA polymerázy s asociovaným faktorem σ^B (Nannapaneni *et al.*, 2012).

Dále existují geny, které sice spadají do regulonu faktoru σ^B , ale zároveň jsou kontrolovány i jinými transkripčními faktory, a proto při čistém porovnání vytvářených proteinů v wt kmenu a *sigB* mutantu nebyly tyto geny do regulonu σ^B zařazeny, přestože do něj patří. Takovýchto genů bylo objeveno dalších 30 a tak nyní známe celkem 196 genů patřících do regulonu σ^B (Nannapaneni *et al.*, 2012). Příkladem genu transkribovaného ze dvou různých promotorů je gen *clpC*, který má promotory pro RNA polymerázu s faktorem σ^A , z něhož je slabě přepisováno po celou dobu a promotor s afinitou k faktoru σ^B , z kterého je silně přepisováno za stresových podmínek. Zvláštností je, že *sigB* deficientní mutant dokáže toto kompenzovat a za stresových podmínek přepisovat silněji i ze σ^A dependentního promotoru (Krüger *et al.*, 1996).

Aktivace transkripce pod kontrolou σ^B je důsledně kontrolována signálně-transdukční kaskádou pomocí několika různých Rsb (Regulator of sigma B) proteinů (shrnutí v obrázku 7). Původně se myslelo, že *sigB* je třetím genem v čtyřgenovém operonu, který má zároveň autoregulační aktivitu. Byla nalezena sekvenční homologie s operonem *spoIIA*, který podobně reguluje aktivitu sporulačního faktoru σ^F (Kalman *et al.*, 1990). Později však bylo objeveno, že tyto čtyři geny jsou pouze dolní část operonu *sigB* pod kontrolou σ^B dependentního promotoru, který předchází 4 geny a σ^A dependentní promotor. (Wise & Price,

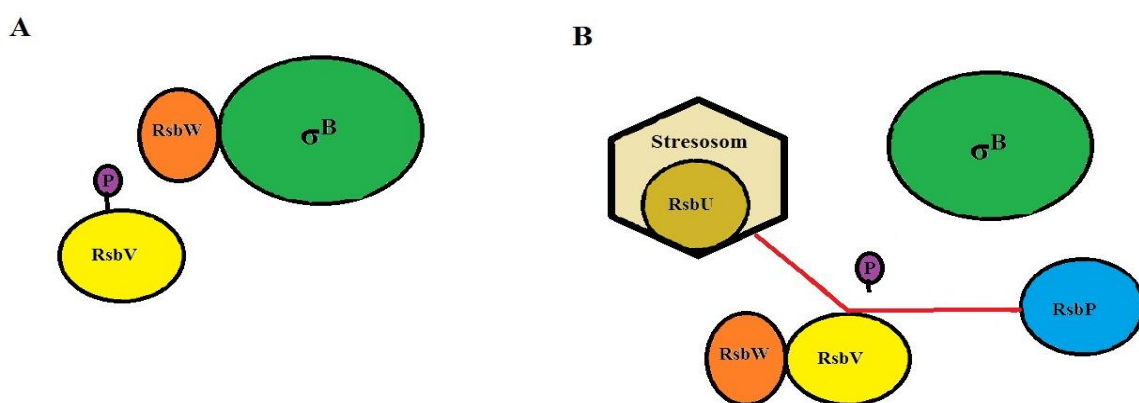
1995). Gen *sigB* se tedy nachází v operonu obsahujícím 8 genů spolu s geny pro různé Rsb proteiny, čímž je zajištěna autoregulace aktivity σ^B .

Aktivita faktoru σ^B je regulována vazbou jeho anti-sigmy RsbW (Benson & Haldenwang, 1993). Pro aktivaci faktoru σ^B je nutné vyvázat jeho anti-sigma RsbW anti-anti-sigmou RsbV. Kromě toho RsbW funguje jako kinasa, která fosforyluje RsbV, čímž mu znemožňuje svoje vlastní vyvázání (Dufour & Haldenwang, 1994). Tato její schopnost klesá při poklesu hladiny ATP. RsbW tedy ztrácí schopnost inaktivovat RsbV za podmínek při nedostatku ATP a proto jsou za těchto podmínek přepisovány GSP (Delumeau *et al.*, 2002).

V exponenciálně rostoucích buňkách je RsbV fosforylováno a přepis genů s σ^B dependentním promotorem je zastaven. Pokud se podmínky zhorší, nicméně buňka zatím nechce přejít do sporulace, je zahájen přepis genů pro GSP. Na této aktivaci se dále podílejí fosfatázy RsbU a RsbP, které anti-anti-sigma RsbV defosforylují a tím umožní její navázání na RsbW a uvolnění faktoru σ^B (Vijay *et al.*, 2000).

Fosfatázy RsbU a RsbP jsou aktivovány různými drahami za pomoci fosforylačních kaskád v reakci na rozličné stresové podmínky. Která fosfatáza RsbV uvolní, závisí na tom, zda je stimulem pro přepis GSP energetický stres (absence glukózy, kyslíku, fosfátu – mají vliv na hladinu ATP) nebo environmentální stres (ten který nemá vliv na hladinu ATP).

Energetické stresy kontroluje jen RsbP (Vijay *et al.*, 2000), environmentální RsbU. Ta pro svoji aktivaci vyžaduje zbylé Rsb proteiny z operonu *sigB* (Yang *et al.*, 1996). Tyto Rsb proteiny se shlukují ve stresosomu, cytoplasmatickém proteinovém komplexu o velikosti



Obrázek 7: Regulace aktivity σ^B (A) Faktor σ^B v inaktivní formě, blokován anti-sigmou RsbW a (B) aktivní faktor σ^B , z kterého byla vyvázána anti-sigma RsbW anti-anti-sigmou RsbV, která byla aktivována defosforylací od jedné ze dvou možných fosfatáz RsbP a RsbU, která je součástí stresosomu Červené čáry naznačují proces defosforylace.

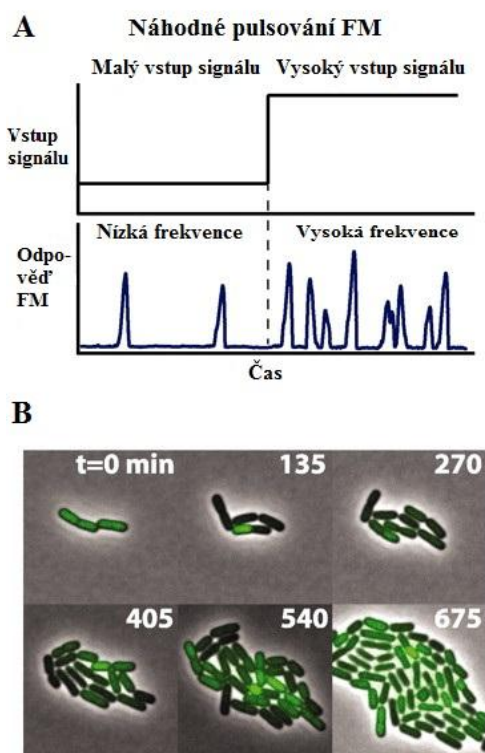
1,8 kDa. Předpokládalo se, že ve stresosomu probíhá kaskáda fosforylací, která je nezbytná pro aktivaci RsbU a následně faktoru σ^B , nicméně poslední studie ukazují, že stresosom je schopen tento alternativní faktor aktivovat i v mutantních kmenech bez schopnosti fosforylace, takže přesný mechanismus zůstává neznámý (Gaidenko & Price, 2014).

Většinou se proteiny pod kontrolou σ^B vyskytují hlavně u nerostoucích a nesporulujících buněk, ale existují výjimky, např. při růstu v nízkých teplotách, kde dochází k přepisu σ^B dependentních genů (15°C). Tato aktivace je navíc nezávislá na anti-anti-sigmě RsbV (a tudíž i na jejích fosfatázách RsbU a RsbP), indukce je však zpožděná a déle trvající (Brigulla *et al.*, 2003).

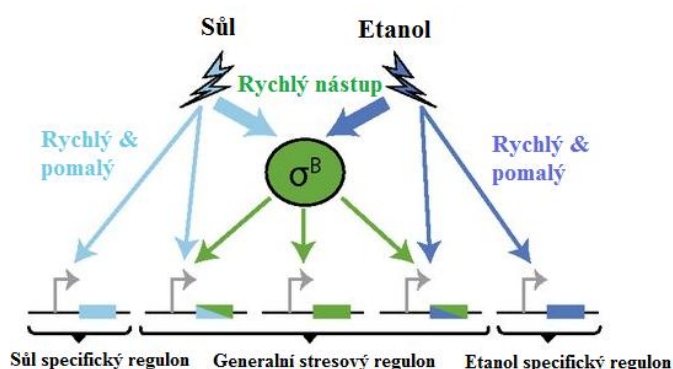
Aktivační drahou nezávislou na RsbV je aktivována transkripce ze σ^B dependentních promotorů i při dlouhodobém vystavení zvýšené teplotě, nicméně tato aktivace byla pozorována jen u mutantů *rsbV*, σ^B byla v tomto případě dokonce nadprodukována. V přítomnosti RsbV je však k aktivaci σ^B dependentních genů použita dráha zahrnující RsbV zcela shodně jako u náhlého tepelného šoku (Holtmann *et al.*, 2004).

Nedávno byla popsána tzv. frekvenční modulace (FM) - jev, při kterém v kolonii buněk není σ^B aktivována současně, ale v každé buňce jinak a s přibývajícím stresem se nezvětšuje síla σ^B dependentní odpovědi, ale frekvence, se kterou k ní v jednotlivých buňkách dochází (viz Obrázek 8). Navíc bylo zjištěno, že toto probíhá spontánně i u buněk

bez stresového podnětu, i když s menší frekvencí (Locke *et al.*, 2011). FM ovšem funguje jen v případě energetického stresu. V případě stresů environmentálních, odpověď na něž prochází stresosomem, je σ^B aktivována konstantně. Zároveň závisí na rychlosti nástupu těchto podmínek, zda bude zahájen přepis GSP pod kontrolou σ^B nebo zda budou transkribovány geny specifické pro daný druh stresu (viz Obrázek 9) (Young *et al.*, 2013).



Obrázek 8: Závislost míry stresu na aktivaci σ^B (A) Schematický model zvětšující se frekvence aktivací σ^B promotoru při stresových podmínkách. (B) Primární data z fluorescenčního mikroskopu při fúzi promotoru pro σ^B se žlutým fosforeskujícím proteinem (YFP), rozdílné aktivace v jednotlivých buňkách, postupné opadávání aktivity a opětovné spouštění transkripce. Upraveno z (Locke *et al.*, 2011)



Obrázek 9: Rychle vyvolaný stres indukuje jak specifickou odpověď, tak nespecifickou (pod kontrolou σ^B), zatímco pomalu vyvolaný stres indukuje spíše specifickou odpověď. Upraveno z (Young *et al.*, 2013)

Ačkoliv faktor σ^B není považován za klasicky sporulační, bylo zjištěno, že se také podílí na rozhodování, zda buňka vstoupí do sporulační fáze či nikoliv. Pod kontrolou faktoru σ^B je totiž gen *spo0E*, jehož produkt defosforyluje Spo0A, který je nutný pro zahájení sporulace. Podmínky ve vnějším prostředí, které indukují přepis GSP tedy zároveň blokují zahájení sporulace. (Reder *et al.*, 2012b).

4.3 Sigma D

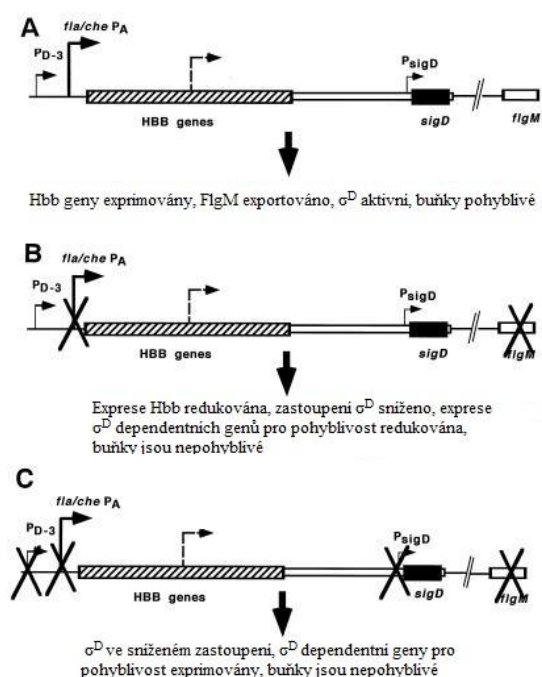
Sigma D je faktor, který je přítomný v pozdní exponenciální fázi růstu. Do regulonu σ^D patří 65 genů, které jsou zodpovědné za sestavení bičíku, chemotaxi a také syntézu autolysinů (Serizawa *et al.*, 2004). Exprese genů pod kontrolou σ^D je regulována její anti-sigmou FlgM (Bertero *et al.*, 1999).

Buňky v rostoucí populaci *B. subtilis* nejsou všechny shodné, ale jsou heterogenní. V souvislosti s faktorem σ^D je můžeme dělit na mobilní (σ^D “ON“) a nemobilní - rostoucí v řetízkách buněk (σ^D “OFF“) (Kearns & Losick, 2005). Faktor σ^D kontroluje pohyblivost, pomocí kontroly transkripce genu *hag* (Mirel & Chamberlin, 1989), jehož produktem je flagellin nezbytný pro stavbu bičíku. Buňky v médiu jsou tedy buď pohyblivé, pokud je tento gen přepisován, nebo nepohyblivé, pokud není. Pohyblivost je spojena také s funkcí autolysinů, což jsou proteiny, které hydrolyzují peptidoglykan buněčné stěny. Tři důležité autolysiny (LytF, LytC a LytD) jsou také pod kontrolou σ^D a podílí se na aktivaci pohyblivosti, nikoliv však syntézy bičíku přímo (Chen *et al.*, 2009). Primární funkcí autolysinů je ovšem hydrolyza peptidoglykanu (PG), čímž autolysiny napomáhají dělení buněk, proto buňky, které je nemají (σ^D “OFF“), tvoří řetízky.

Gen *sigD* je předposledním genem v operonu *fla/che*, který je σ^A dependentní a ve kterém se nachází geny pro stavbu bičíku a chemotaxi (Zuberi *et al.*, 1990). Takto produkovaná σ^D poté kontroluje ostatní geny nutné pro pohyblivost a chemotaxi (Serizawa *et*

al., 2004). Transkripce z *fla/che* operonu je řízena silným σ^A dependentním promotorem (P_A), ale také obsahuje slabší σ^D promotor (P_{D-3}) a interní σ^D dependentní promotor (P_{sigD}) těsně před genem *sigD*, které nicméně nejsou nutné pro správnou transkripci (viz Obrázek 10) (West *et al.*, 2000).

Přepis z operonu *fla/che* je závislý také na dalších regulačních proteinech, například na aktivátoru SwrA, který zároveň aktivuje další regulační protein přítomný v tomto operonu SwrB, který taktéž aktivuje σ^D dependentní transkripci (Kearns & Losick, 2005). Některé



geny aktivované σ^D jsou také kontrolovány dvojicí proteinů SlrR a SinR, které blokují dělení a pohyblivost (Chai *et al.*, 2010). Jejich efekt ještě zvětšuje přítomnost proteinu SinA (Cozy *et al.*, 2012). Na regulaci se také podílí DegU, který ve fosforylované formě, v níž je v nemobilních buňkách, aktivuje expresi anti-sigmy FlgM, takže DegU σ^D inhibuje (Hsueh *et al.*, 2011). Regulace pohyblivosti a chemotaxe tedy není zdaleka tak přímočará. První fáze této regulace probíhá na úrovni operonu *fla/che*, druhá pak u všech σ^D dependentních genů.

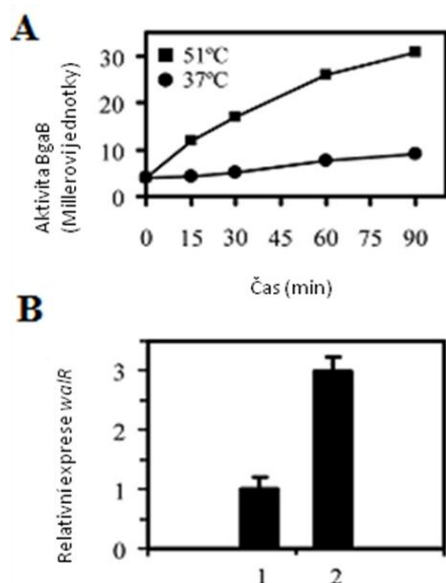
Obrázek 10: Míra transkripce genů operonu *fla/che* při delecích v jednotlivých promotorech.
 Upraveno z (West *et al.*, 2000)

4.4 Sigma I

V roce 2001 bylo zjištěno, že faktor σ^I je indukován teplem a tudíž potřebný pro přežití za zvýšených teplot (55 °C); a že má ve svém regulonu gen *gsiB* (Zuber *et al.*, 2001), který je také součástí σ^B regulonu a je přepisován v odpovědi na různé stresové podněty (Maul *et al.*, 1995). Do regulonu σ^I také patří několik dalších genů, které byly objeveny později. Mezi nimi aktinový homolog *mreBH* a gen pro bacitracinovou rezistenci *bcrC* (Tseng & Shaw, 2008) a také gen pro hydrolázu buněčné stěny *lytE* (Tseng *et al.*, 2011).

Bylo předpokládáno, že přepis σ^I je zajišťován ze σ^I dependentního promotoru, čímž je její aktivace autoregulována. Nicméně v poslední době bylo zjištěno, že v oblasti za σ^I dependentním promotorem se nachází promotor pro σ^A (Salzberg *et al.*, 2013). Mezi těmito

dvěma promotory je regulační místo pro vazbu proteinu WalR, který pravděpodobně hraje důležitou roli ve spouštění transkripce právě ze σ^A dependentního promotoru a inhibici transkripce z promotoru s afinitou k σ^I . Zajímavou skutečností je fakt, že toto WalR vazebné místo mají s jednou výjimkou také všechny proteiny doposud zahrnované do σ^I regulonu.



Obrázek 11: Indukce WalR transkripce teplem šokem. (A) *walR* promotor byl fúzován s genem *bgaB*, integrován do *amyE* lokusu. Buňky byly následně napěstovány do hodnoty $OD_{600}=0,3$ v 37°C a poté byly rozděleny na dvě frakce (v tento moment je na grafu čas 0). Jedna byla pěstována při 37°C a druhá při 51°C. V různém čase byla měřena aktivita fúzovaného proteinu. Tyto údaje jsou průměrem ze dvou nezávislých měření, ve kterých se jednotlivé hodnoty nelišily o více jak 15%. (B) Míra exprese WalR při 37 a 51 sledovaná pomocí RT-qPCR. Upraveno z (Huang et al., 2013)

4.5 Sigma H

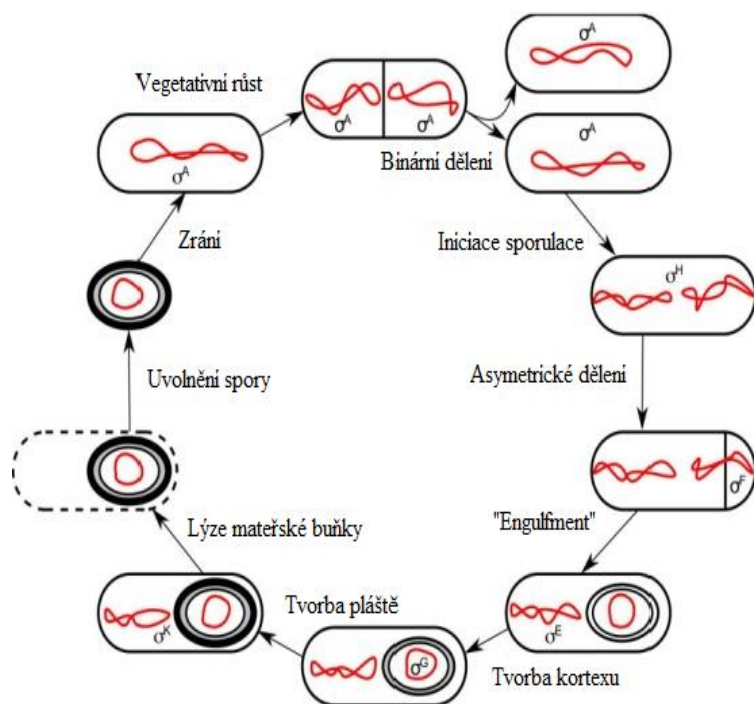
Alternativní faktor σ^H kontroluje expresi genů, které jsou nutné pro přechod z exponenciální do stacionární fáze růstu. Některé z genů nejsou jen pod kontrolou σ^H , ale jsou přepisovány i ze σ^A dependentního promotoru. Bylo nalezeno celkově 87 genů pod přímou kontrolou σ^H , u spousty dalších je předpokládána kontrola nepřímá (Britton et al., 2002). Regulace odpovědi na stresové podněty pomocí faktorů sigma se nicméně překrývá a je schopna se vzájemně nahrazovat, což dokazuje např. zvýšení transkripce některých genů ze σ^B dependentního promotoru v reakci na nedostatek aminokyselin u *sigH* mutantu, zatímco u wt kmenu k tomuto zvýšení nedochází (Eymann & Hecker, 2001).

Faktor σ^H ovlivňuje kromě přechodu do stacionární fáze také přechod do sporulace, jelikož kontroluje transkripci hlavního sporulačního faktoru Spo0A (Predich *et al.*, 1992). Jeho přítomnost v buňce naopak reprimuje protein AbrB (Perego *et al.*, 1988), což je hlavní negativní regulátor σ^H (Weir *et al.*, 1991). AbrB je negativní regulátor genů pro stacionární fázi a sporulaci, váže se na specifickou sekvenci, která překrývá promotorovou oblast daného genu (Strauch, 1995). Gen *sigH*, dříve nazýván *spo0H*, leží v monocistronním operonu a je přepisován ze σ^A dependentního promotoru (Weir *et al.*, 1991).

4.6 Sporulační faktory

Sporulace je proces, ke kterému u *B. subtilis* dochází za nedostatku živin. Při sporulaci jsou přepisovány geny za pomoci 4 různých alternativních faktorů sigma, které se vzájemně aktivují v kaskádě závislé na stupni sporulace. Prvním je σ^F , který začíná řídit přepis genů v čerstvě utvořené spoře, poté je v mateřské buňce aktivován přepis σ^E dependentních genů, následuje opět ve spoře přepis pod kontrolou σ^G , která ovlivňuje aktivitu σ^K v mateřské buňce (kaskáda viz Obrázek 12). Kromě této vzájemné regulace jednotlivé faktory kódují další

negativní regulátory, které brání expresi jimi přepisovaných genů. Příkladem jsou GerR a SpoIIID, přepisované σ^E či GerE pod kontrolou σ^K (Eichenberger *et al.*, 2004), což ze sporulace činí vysoce kontrolovaný proces. Na následujících řádcích blíže přiblížím funkce jednotlivých sporulačních faktorů a jejich vzájemnou regulaci.



Obrázek 12: Jednotlivé fáze sporulačního cyklu a při nich používané faktory sigma. Upraveno z (de Hoon *et al.*, 2010)

4.6.1 Sigma F

Tento faktor začíná fungovat v čerstvě utvářené spoře hned po asymetrickém dělení. V roce 2006 bylo objeveno 48 genů organizovaných do 36 transkripčních jednotek, které kontroluje, 14 z nich je poté také pod kontrolou druhého faktoru působícího ve spoře, tedy σ^G (Wang *et al.*, 2006). Do regulonu σ^F patří i gen *rsfA*, který kóduje DNA vazebný protein, jenž pozitivně i negativně reguluje transkripci dalších genů ze σ^F regulonu (Wu & Errington, 2000), mezi nimi i *spoIIR*, jehož produkt spouští štěpení Pro- σ^E v mateřské buňce (Hofmeister *et al.*, 1995). Transkripce probíhá již v momentě, kdy ve vznikající spoře je pouze první část duplikované DNA. To dokazuje fakt, že značná část genů σ^F regulonu leží v místě polárního lokalizačního signálu, za který je tato část DNA do vznikající spory přiváděna, naopak v oblasti, která do spory vstupuje poslední, žádné geny pod kontrolou σ^F nejsou (Wang *et al.*, 2006).

Geny z regulonu σ^F můžeme rozdělit do dvou kategorií, na geny regulační, které řídí expresi dalších genů a kaskádu sporulačních faktorů sigma, a na geny strukturní, jejichž produkty se podílí na morfogenezi a zrání spory.

Gen *sigF* se nachází v operonu spolu s genem pro svoji anti-sigmu (*spoIIAB*) a anti-anti-sigmu (*spoIIAA*) jako třetí člen toho tricistronního operonu (Schmidt *et al.*, 1990). Pro aktivaci faktoru σ^F je potřeba dosáhnout jeho prahové hodnoty, čemuž ovšem brání vazba na anti-sigmu SpoIIAB. Ta může tvořit komplex se SpoIIAA a tím aktivovat σ^F , k tomu ale dochází až po dokončení septace (Carniol *et al.*, 2004).

Protein SpoIIAA je držen v neaktivním fosforylovaném stavu, který je zrušen membránově vázanou serinovu fosfatázou SpoIIE (Arigoni *et al.*, 1996) až po vytvoření septa mezi vznikající sporou a mateřskou buňkou.

SpoIIE má 3 domény. Jednu membránovou, druhou s fosfatázovou aktivitou a třetí související s tvorbou septa, která navíc dosud neznámým mechanismem reguluje fosfatázu. Mělo se za to, že k této regulaci dochází v důsledku kontaktu s FtsZ, nicméně k ní dochází již před vytvořením septa, takže tento mechanismus kontroly zatím zůstává neznámý (Feucht *et al.*, 2002).

4.6.2 Sigma E

Prvním z dvojice sporulačních faktorů v mateřské buňce je σ^E ; v jeho regulonu se nachází 262 genů ve 163 transkripčních jednotkách. Mezi nimi jsou také geny

pro transkripční faktory SpoIIID a GerR, které se poté podílejí na aktivaci σ^K (Eichenberger *et al.*, 2003, 2004).

Přepis operonu *spoIIG*, ve kterém se nachází gen pro σ^E , začíná již před začátkem sporulace a je zajišťován ze σ^A dependentního promotoru pod kontrolou sporulačního faktoru Spo0A (York *et al.*, 1992), který také zajišťuje, aby přepis těchto genů byl prováděn pouze v mateřské buňce (Fujita & Losick, 2003). Faktor σ^E je takto ovšem translatován v neaktivní formě coby Pro- σ^E , kterému je poté uštipnuto 29 AMK z N-konce v momentě, kdy je potřeba začít transkribovat v mateřské buňce ze σ^E dependentních promotorů (LaBell *et al.*, 1987).

Signál pro toto štěpení vychází ze spory pomocí proteinu SpoIIR, který je pod kontrolou σ^F a který napomáhá proteáze SpoIIGA aktivovat štěpením faktor σ^E (Hofmeister *et al.*, 1995). Gen *spoIIGA* se nachází ve stejném operonu jako *sigE* (Jonas *et al.*, 1988). Oba v něm kódované proteiny jsou membránově vázány. SpoIIGA je vázán do mateřské strany septa a po své aktivaci štěpí Pro- σ^E a tím ji uvolňuje z membrány (Fawcett *et al.*, 1998).

4.6.3 Sigma G

Druhým faktorem ve vznikající spore je σ^G . Přepis genů pod jeho kontrolou začíná v momentě, kdy je prespora obklopena dvouvrstvou membránou a oddělena od membrány mateřské buňky.

Do regulonu σ^G patří mj. *spoIVFB*, který kóduje hlavní regulátor přepisu genů pod kontrolou σ^K , což je další příklad kaskádovitěho uspořádání sporulačních faktorů sigma. Dalším genem pod kontrolou σ^G je gen *spoVT*, jehož proteinový produkt následně ovlivňuje transkripci dalších genů σ^G regulonu (Bagyan *et al.*, 1996). Mezi geny, jejichž činnost tento protein inhibuje, je i samotný *sigG*, naopak aktivuje *spoIVB*, čímž napomáhá k přepnutí transkripce na σ^K dependentní (více v kapitole sigma K) (Wang *et al.*, 2006).

Faktor σ^G je kódován genem *sigG*, dříve také nazývaným *spoIIIG*. Gen *sigG* je zpočátku přepisován pomocí σ^F , po ustálení určité hladiny již svoji expresi kontroluje sám. Poslední studie ukazují, že pro aktivaci σ^G je nutné oddělení vznikající spory od mateřské membrány (tzv. engulfment) a teprve po ukončení tohoto procesu je σ^G aktivována. K tomuto oddělení je nutné přenést již veškerou DNA do tvořící se spory. V minulosti byl objeven “krmicí kanál” propojující mateřskou buňku a sporu a bylo předpokládáno, že právě jeho přítomnost aktivuje σ^G (Camp & Losick, 2009), nicméně způsob jakým je engulfment a aktivace σ^G propojen zůstává zatím neznámý (Regan *et al.*, 2012).

Protein, který se podílí na přepnutí transkripce ze σ^F na σ^G , se nazývá Fin (dříve YabK). *Fin* může být transkribován pomocí RNA polymerázy s asociovaným faktorem σ^F i σ^G a svojí aktivitou utlumuje σ^F (viz Obrázek 13). V mutantech *fin* postrádajících nedochází k plnému utlumení transkripce pod kontrolou σ^F a naopak nezačíná plně transkripce ze σ^G

dependentních genů (Camp *et al.*, 2011). Tato aktivace tedy nemůže být jediná a její přesný mechanismu je zatím nejasný.

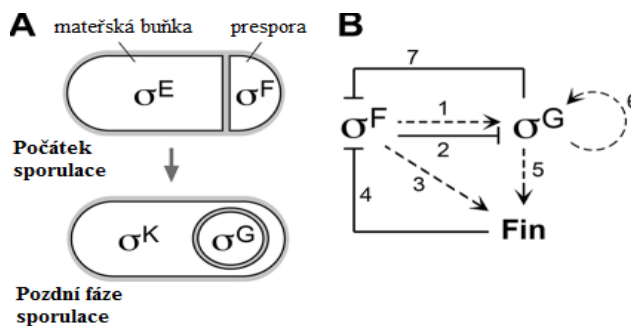
Dalším proteinem, který se podílí na aktivaci přepisu σ^G dependentních genů je CsfB, kterému předchází σ^F dependentní promotor. V kmenu s mutací v genu *csfB* dochází k předčasné aktivaci σ^G , proto je předpokládáno, že CsfB přímo blokuje funkci σ^G (Chary *et al.*, 2007).

Kromě těchto mechanismů působících ve spoře musí buňka také zajistit, aby při sporulaci nedocházelo k přepisu σ^G dependentních genů v mateřské buňce či mimo sporulaci. K tomu využívá proteiny SpoIIAB a LonA, které faktor σ^G blokuje (Chary *et al.*, 2005).

V regulonu σ^G se nachází celkově 95 genů (Wang *et al.*, 2006). Stejně jako u faktoru σ^F i u σ^G můžeme regulon rozdělit na dvě skupiny: jednak geny regulační (např. *spoIVB*, *spoVT*), a dále geny, jejichž produkty se podílejí na stavbě kortexu či na obranných mechanismech spory proti nepříznivým podmínkám. Naopak v regulonu σ^G (ani σ^F) se téměř nevyskytují geny metabolismu, který vznikající spoře zajišťuje mateřská buňka (Wang *et al.*, 2006).

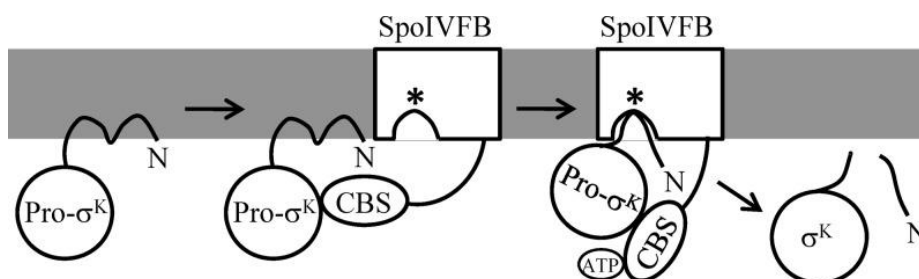
4.6.4 Sigma K

Poslední sporulačním faktorem je σ^K , jeho zvláštností je, že není kódován jedním, nýbrž dvěma geny. Konkrétně gen *spoIVCB* kóduje její N koncovou část, zatímco gen *spoIIIC* kóduje C koncovou část. Tyto dva geny leží 10kb od sebe a jsou následně v mateřské buňce propojeny místně specifickou rekombinázou SpoIVCA a utváří neaktivní prekurzor Pro- σ^K (Sato *et al.*, 1990; Stragier *et al.*, 1989).



Obrázek 13: (A) Regulační kaskáda sporulačních faktorů (B) Model přepnutí ze σ^F na σ^G pomocí proteinu Fin. Upraveno z (Camp *et al.*, 2011)

Neaktivní prekurzor $\text{Pro-}\sigma^{\text{K}}$ se nachází na vnější membráně vznikající spory a pro jeho aktivaci je nutné z prekurzoru $\text{Pro-}\sigma^{\text{K}}$ nejprve odštěpit 20 aminokyselin na N konci intermembránovou metaloproteázou SpoIVFB (Yu & Kroos, 2000). Ta je ovšem držena v inaktivním stavu pomocí proteinů SpoIVFA a BofA (Rudner & Losick, 2002; Zhou & Kroos, 2004). Aktivaci celé této kaskády zajišťují serinové proteázy produkované vznikající sporou. Konkrétně jde o proteázu SpoIVB, která v intermembránovém prostoru vznikající spory naštěpí SpoIVFA, což je následováno naštěpením BofA pomocí proteázy CtpB (Zhou & Kroos, 2005). Tím se uvolní SpoIVFB pro štěpení $\text{Pro-}\sigma^{\text{K}}$ na výsledný faktor σ^{K} (viz Obrázek 14). SpoIVFB vyžaduje pro správné štěpení $\text{Pro-}\sigma^{\text{K}}$ vazbu svého C-konce na ATP, což znamená, že sporulace u *B. subtilis* je závislá na množství energie (Zhou *et al.*, 2009).



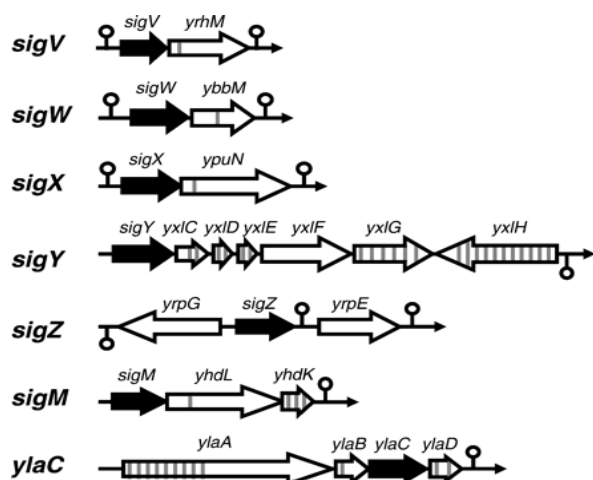
Obrázek 14: Proces štěpení membránově vázané $\text{Pro-}\sigma^{\text{K}}$ pomocí CBS domény proteázy SpoIVFB za účasti ATP. Převzato z (Zhou *et al.*, 2013)

Faktor σ^{K} řídí transkripci genů v mateřské buňce na konci sporulace, pod jeho kontrolou jsou přepisovány geny pro vytvoření kapsule okolo vznikající spory a pro lýzi mateřské buňky (Zhang *et al.*, 1994). Také kontroluje regulátor GerE, který transkripci většiny těchto genů negativně či pozitivně ovlivňuje (Zheng *et al.*, 1992).

4.7 ECF faktory

ECF faktory jsou faktory, které reagují na vnější (extracytoplasmatické) podněty. Do kategorie ECF faktorů sigma se u *B. subtilis* řadí 7 faktorů. Specifické pro ně je, že mají pouze domény 2 a 4 ze σ^{70} a ve většině případů jsou autoregulovány. Jejich regulony se často překrývají, což může být způsobeno tím, že rozeznávají stejné motivy AAC v oblasti -35 a CGT v oblasti -10 promotoru a liší se jen v dalších pozicích (Hermann, 2002). Také je pro ně typické, že jsou kódovány v operonu spolu se svojí anti-sigmou (viz Obrázek 15).

V následujícím textu budou ECF faktory probírány od nejprozkoumanějších k méně prozkoumaným.



Obrázek 15: Organizace operonu v nichž se nachází geny pro ECF faktory u *B. subtilis*. Šipky znázorňují geny, plné šipky geny kódující jednotlivé faktory sigma. Kolečko na stopce předpokládané transkripční terminátory, čárkované oblasti genů jsou předpovězeny coby membránové programem SOSUI. Převzato z (Yoshimura, 2004).

4.7.1 Sigma M

Faktor σ^M je kódován genem *sigM*, jehož transkripce byla zaznamenána ze dvou promotorů: P_A , z kterého je přepisována konstantně za pomoci vegetativního faktoru σ^A a P_M , pomocí kterého je σ^M autoregulována, stejně jako ostatní ECF (Horsburgh & Moir, 1999). Za genem *sigM* se nachází geny *yhdL* a *yhdK*, které jeho aktivitu negativně regulují (Horsburgh & Moir, 1999).

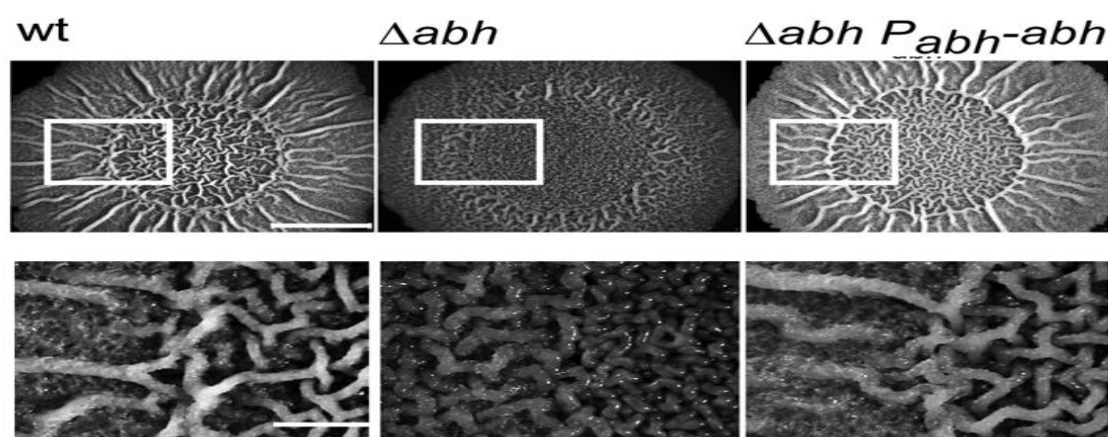
Přepis ze σ^M dependentních promotorů je aktivován různými stresovými podmínkami, které mají společnou vlastnost, tj. narušování syntézy buněčného obalu (všechny vnější vrstvy počínaje membránou). Konkrétně se jedná o slané prostředí, nízké pH, teplo, etanol a některá antibiotika: bacitracin, vankomycin či fosfomycin. Faktor σ^M také zajišťuje buňkám rezistenci vůči β -laktamovým antibiotikům. V jeho regulonu se totiž nachází gen pro diadenylát cyklázu (*DisA*), která se podílí na výrobě diadenylát cyklátu (c-di-AMP), který je pro tuto rezistenci nutný. Přesný mechanismus však není znám. C-di-AMP pozitivně přispívá i k rezistenci vůči dalším antibiotikům působícím proti syntéze buněčné stěny, např. moenomycinu (Luo & Helmann, 2012). Dalším důležitým enzymem v jejím regulonu je HMW PBP, který zajišťuje syntézu buněčné stěny (Eiamphungporn & Helmann, 2008). Faktor σ^M je pravděpodobně zodpovědný také za rezistenci vůči větším koncentracím solí, jelikož *sigM* deficientní kmen při nich lyzuje (Horsburgh & Moir, 1999).

Faktor σ^M však také hraje roli při exponenciálním růstu za vhodných podmínek, kde je nejvíce aktivní v jeho první polovině (Thackray & Moir, 2003). Celkově bylo nalezeno 57 genů (ve 30 operonech), které jsou pod přímou kontrolou faktoru σ^M a dalších 20-30 genů, které jsou aktivovány σ^M dependentním proteinem Spx (Eiamphungporn & Helmann, 2008). Tyto geny kódují především proteiny pro stavbu buněčné stěny a určení buněčného tvaru, což souvisí s výše zmíněnými podmínkami, které σ^M aktivují. Protože je většina těchto genů pro buňku velmi důležitá, velká část regulonu σ^M se překrývá s regulony dalších ECF, jak již bylo naznačeno v úvodu k ECF faktorům (Eiamphungporn & Helmann, 2008).

4.7.2 Sigma X

Gen *sigX* je kódován v operonu spolu s anti-sigmou *rsiX* a přepisován ze σ^X dependentního promotoru, před kterým se ovšem nachází i promotor pro vegetativní faktor σ^A (Brutsche & Braun, 1997; Huang *et al.*, 1997). Činnost sigmy je indukována inhibitory syntézy PG v buněčné stěně a tunicamycinem, který inhibuje syntézu teichoové kyseliny (Pooley & Karamata, 2000).

Faktor σ^X má částečně se překrývající regulon s dalším ECF σ^M , takže se podílí například na rezistenci vůči β -laktamovým antibiotikům v *sigM* mutantních kmenech. (Luo & Helmann, 2012). Geny pod kontrolou σ^X se podílí také na tvorbě biofilmu, jelikož v reakci na doposud neznámé extracytoplasmatické podněty spouští transkripci proteinu Abh, což je homolog AbrB, který kontroluje expresi SlrR, pod jehož kontrolou jsou geny pro extracytoplasmatickou matrix (EM) biofilmu (viz Obrázek 16) (Murray *et al.*, 2009).



Obrázek 16: Kontrola utváření biofilmu pomocí Abh. Biofilm divokého kmene (wt), *abh* mutantu a *abh* mutantu s genem pro *abh* vloženém na jiné místo pod kontrolou vlastního Abh dependentního promotoru. Převzato z (Murray *et al.*, 2009).

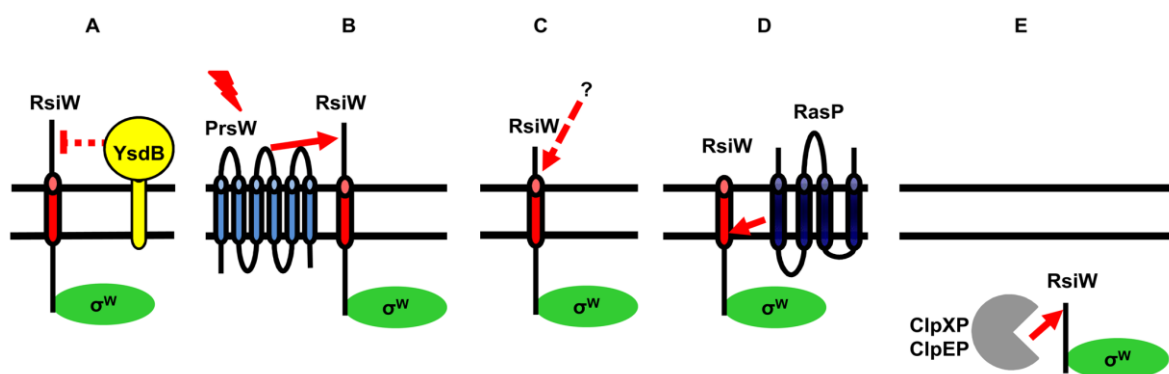
Do regulonu sigmy X patří také operon *dlt*, který je kontrolován taktéž σ^V a který má za úkol regulovat D-alanylní teichoové kyseliny (Huang *et al.*, 1997). Celkově můžeme říci, že jsou v tomto regulonu geny pro kontrolu metabolismu a struktury buněčné stěny, které mají tu společnou vlastnost, že jsou transkribovány z více promotorů, takže nejsou zcela závislé na σ^X (Huang *et al.*, 1997).

4.7.3 Sigma W

Faktor σ^W patří k nejlépe prostudovaným ECF faktorům. Přepis genů pod jeho kontrolou je indukován v reakci na stresy vyvolané zásaditým prostředím (Wiegert *et al.*, 2001) či antibiotiky působícími na buněčnou stěnu (Cao *et al.*, 2002) a především v reakci na antimikrobiální látky produkované jiným bakteriemi (Ellermeier & Losick, 2006).

Gen *sigW* se nachází v jednom operonu s genem *rsiW*, který kóduje jeho membránově vázanou anti-sigma (Schöbel *et al.*, 2004). Ta blokuje vazbou na σ^W její aktivitu a pro uvolnění σ^W musí být RsiW naštěpena, nicméně i při absenci proteáz neblokuje σ^W zcela a ta má částečnou aktivitu (Zweers *et al.*, 2012).

Pro aktivaci σ^W je RsiW štěpena dvěma membránovými proteázami. V místě 1 proteázou PrsW, která zřejmě zároveň působí jako molekula, která přijímá vnější signál a spouští toto štěpení (Ellermeier & Losick, 2006), a jí aktivovanou proteázou RasP v místě 2 (Schöbel *et al.*, 2004). Po štěpení RasP je σ^W se zbytky RsiW uvolněna do cytosolu a tam jsou zbytky anti-sigmy odstraněny Clp proteázami (konkrétně ClpXP, nicméně mutace v ClpX může být částečně nahrazena dalšími zástupci Clp proteáz) (Zellmeier *et al.*, 2006). Nedávno bylo publikováno, že mezi štěpením PrsW a RasP pravděpodobně dochází ještě k jednomu



Obrázek 17: Kaskáda aktivující faktor σ^W . (A) Pokud buňka není stresována, σ^W se váže na RsiW a je inaktivní, k čemuž přispívá i YsdB (B) po vystavení buňky stresu je RsiW štěpena nejprve PrsW, poté (C) neznámou proteázou a poté (D) RasP proteázou. Po uvolnění do cytosolu (E) jsou zbytky odstraněny Clp proteázami. Převzato z (Ho & Ellermeier, 2012)

štěpení, nicméně enzym, který by za to byl zodpovědný, zatím nebyl nalezen (Heinrich *et al.*, 2009). Celá regulační kaskáda je shrnuta v obrázku 17. Dalším negativním regulátorem aktivity σ^W je protein YsdB, ale mechanismus inhibice je však zatím také neznámý (Ellermeier & Losick, 2006).

V nedávné studii Zweerse a spolupracovníku z roku 2012 bylo identifikováno 68 genů coby členů σ^W regulonu. Zajímavým zjištěním je fakt, že transkripce σ^W dependentních genů má negativní vliv na geny ležící na opačném vlákně, jejichž exprese se v *sigW* mutantu zvýší (Zweers *et al.*, 2012). V průběhu vývojových cyklů jsou geny pod kontrolou σ^W přepisovány především v stacionární fázi (Yang *et al.*, 2014). Faktor σ^W kontroluje operon *fabHa fabF*, který je zodpovědný za snižování membránové fluidity a díky čemuž získává buňka větší rezistenci vůči výše zmíněným podmínkám (Kingston *et al.*, 2011).

4.7.4 Sigma V

Faktor σ^V je kódován genem *sigV*, který je transkribován spolu s genem pro anti-sigma RsiV (Zellmeier *et al.*, 2005) a tudíž je autoregulován. Byly objeveny další 2 geny, které se v tomto operonu nacházejí: *oatA* (O-acetyltransferáza) a *yrhK* (doposud neznámá funkce) (Ho *et al.*, 2011).

Aktivita tohoto faktoru je indukována lysozymem, který štěpí peptidoglykan bakterií. Rezistenci zajišťuje o-acetyltransferáza OatA, která přemísťuje acetylovou skupinu v peptidoglykanu a tím zamezuje lysozymu ve fungování (Guariglia-Oropeza & Helmann, 2011). Kromě svého operonu zajišťuje σ^V také přepis operonu *dltABCDE*, který se také podílí na rezistenci vůči lysozymu. Jeho produkt provádí D-alanylace (Perego *et al.*, 1995) a při rezistenci k lysozymu je spolu s OatA vzájemně zastupitelný (Guariglia-Oropeza & Helmann, 2011). Při pokusech v kmeni postrádajícím ostatní ECF faktory bylo nalezeno zhruba dalších 30 operonů, které σ^V může transkribovat. Většina z nich již byla předtím popsána jako členové regulonů jiných ECF nebo také σ^B . Při snaze o nalezení rozlišnosti promotorové sekvence těchto ECF, jejichž funkce se σ^V překrývá, byla také nalezena T bohatá oblast mezi -30 a -26 pozicí, specifická pro σ^V dependentní promotory (Guariglia-Oropeza & Helmann, 2011; Hastie *et al.*, 2013)

Faktor σ^V je za normálních okolností blokován vazbou na anti-sigma RsiV. Pro transkripci genů kontrolovaných σ^V je tedy nutné, aby byl tento anti-sigma naštěpen. K tomu dochází po kontaktu buňky se specifickým signálem, který spustí stejně jako u dalších ECF kaskádu štěpení, pomocí které je faktor anti-sigma odstraněn. Pro štěpení v místě 2 je použit

stejný enzym jako u σ^W – tedy RasP (Hastie *et al.*, 2013), zatímco pro místo 1 je použit jiný, doposud neobjevený enzym.

4.7.5 Sigma Y

Faktor σ^Y stejně jako ostatní ECF přepisuje svůj vlastní operon, který kromě něho obsahuje dalších 6 genů doposud neznámé funkce *yslC*, *yslD*, *yslE*, *yslF*, *yslG* a *yslH* a také aktivuje přepis genu *ybgB* (Cao *et al.*, 2003). Proteinový produkt genu *yslD* se pravděpodobně účastní negativní regulace aktivity σ^Y . Gen *sigY* naopak negativně reguluje translaci posledního genu *yslH* pomocí mRNA interference (Tojo *et al.*, 2003).

Zdá se, že σ^Y se podílí na přepisu genů pro produkci a rezistenci vůči některým antibiotikům, poslední studie ukázala, že σ^Y pomáhá udržet v genomu profága Sp β , který obsahuje geny rezistence proti sublancinu (Mendez *et al.*, 2012).

4.7.6 Sigma Z

Alternativní faktor σ^Z byl poprvé popsán na základě sekvenční homologie k ostatním faktorům sigma ve studii Sorokina a spolupracovníků z roku 1997. V DNA microarray experimentu byly nalezeny 3 geny, včetně *sigZ*, které jsou touto sigmou ovlivňovány (Asai *et al.*, 2003). Faktor σ^Z je zároveň jediným ECF faktorem, který zřejmě nemá ve svém operonu svoji anti-sigmu, jelikož *sigZ* se zdá být monocistronní a jehož transkripce není zajištěna RNA polymerázou s příslušným faktorem, tedy σ^Z (Asai *et al.*, 2003). Funkce tohoto faktoru v buňce zůstává nejasná.

4.7.7 YlaC

YlaC je poslední faktor sigma z rodiny ECF. Gen *ylaC* se nachází v operonu spolu s geny *ylaA*, *ylaB* a *ylaD*. Protein YlaD pravděpodobně funguje jako transmembránová anti-sigma a YlaB svojí vazbou na YlaD (Yoshimura, 2004) její aktivitu kontroluje (Matsumoto *et al.*, 2005). Do regulonu YlaC patří kromě jeho vlastního operonu další tři geny, konkrétně *rplJ*, *yjeA* a *pdhD* (Asai *et al.*, 2003). Fyziologická funkce YlaC zůstává nejasná. Zatím byla zjištěna pouze její aktivace v odpovědi na oxidativní stres pomocí změn redoxního potenciálu u anti-sigmy YlaD (Ryu *et al.*, 2006).

4.8 YvrI-YvrHa

Tento faktor sigma je zvláštní především svojí strukturou, jelikož se skládá ze dvou proteinů. Protein YvrI vykazuje sekvenční homologii pouze s doménou 4 σ^{70} , ale postrádá doménu 2, kterou všechny ostatní faktory sigma mají (MacLellan *et al.*, 2008). Za ním v operonu se nachází gen pro protein YvrHa, který obsahuje sekvenční homologii naopak s regionem 2 σ^{70} , díky čemuž váže oblast -10 promotoru, zatímco YvrI váže -35 oblast. Tyto dva proteiny tedy fungují dohromady jako jeden funkční faktor sigma (MacLellan *et al.*, 2009a).

Faktor YvrI-YvrHa má ve svém regulonu 3 operony (*oxdC-yvrL*, *yvrJ*, a *yvrI-yvrHa*). Nejdůležitější z nich je gen *oxdC*, který kóduje exocytoplasmatickou oxalát dekarboxylázu, která spotřebou protonů napomáhá buňce růst za kyselých podmínek (MacLellan *et al.*, 2008). V jeho regulonu se také nachází *yvrL*, možný membránově vázaný faktor anti-sigma, který zabraňuje akumulaci oxalát dehydrogenázy za nekyselých podmínek (MacLellan *et al.*, 2009b). Další zajímavostí je, že tento alternativní faktor sigma, na rozdíl od ostatních alternativních faktorů, nemá schopnost vázat DNA bez navázání na jádro RNA polymerázy (MacLellan *et al.*, 2008), čímž se podobá spíše *housekeeping* sigmám.

5 Závěr

Tato práce mapuje klíčové informace o použití, regulonech a regulaci u známých faktorů sigma v půdní modelové G^+ bakterii *B. subtilis*. U některých faktorů v tomto organismu (např. σ^I) zatím nejsou známy přesné mechanismy jejich aktivace, ani regulony a funkce. U nemodelových organismů se vyskytují i další faktory odlišných struktur a funkcí, jejichž přesné popsání je otázkou budoucnosti.

Kromě regulace transkripční iniciace samotnými faktory sigma, případně jinými transkripčními faktory, existují i další možnosti regulace. Jednou z nich je regulace pomocí senzitivity vůči koncentraci iNTP, která byla zatím popsána pouze u *housekeeping* faktoru σ^A , nikoliv však u faktorů alternativních. Svoji budoucí diplomovou práci bych tedy rád zaměřil na zodpovězení otázky, zda k tomuto mechanismu regulace může docházet i u alternativních faktorů sigma.

6 Použitá literatura

- Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., and Gross, C.A. (1999). The *Escherichia coli* σ^E -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- σ factor. *Genes Dev.* 13, 2449–2461.
- Ali, N.O., Bignon, J., Rapoport, G., and Debarbouille, M. (2001). Regulation of the Acetoin Catabolic Pathway Is Controlled by Sigma L in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 2497–2504.
- Arigoni, F., Duncan, L., Alper, S., Losick, R., and Stragier, P. (1996). SpoIIE governs the phosphorylation state of a protein regulating transcription factor sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 3238–3242.
- Asai, K., Yamaguchi, H., Kang, C.-M., Yoshida, K., Fujita, Y., and Sadaie, Y. (2003). DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* sigma factors of extracytoplasmic function family. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 155–160.
- Asai, K., Ootsuji, T., Obata, K., Matsumoto, T., Fujita, Y., and Sadaie, Y. (2007). Regulatory role of RsgI in sigI expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 153, 92–101.
- Bagyan, I., Hobot, J., and Cutting, S. (1996). A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 4500–4507.
- Benson, A.K., and Haldenwang, W.G. (1993). *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 2330–2334.
- Bertero, M.G., Gonzales, B., Tarricone, C., Cecilian, F., and Galizzi, A. (1999). Overproduction and Characterization of the *Bacillus subtilis* Anti-sigma Factor FlgM. *J. Biol. Chem.* 274, 12103–12107.
- Bose, D., Pape, T., Burrows, P.C., Rappas, M., Wigneshweraraj, S.R., Buck, M., and Zhang, X. (2008). Organization of an Activator-Bound RNA Polymerase Holoenzyme. *Mol. Cell* 32, 337–346.
- Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Volker, A., Bremer, E., and Volker, U. (2003). Chill Induction of the SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Its Contribution to Low-Temperature Adaptation. *J. Bacteriol.* 185, 4305–4314.
- Britton, R.A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R., and Grossman, A.D. (2002). Genome-Wide Analysis of the Stationary-Phase Sigma Factor (Sigma-H) Regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 4881–4890.
- Brutsche, S., and Braun, V. (1997). SigX of *Bacillus subtilis* replaces the ECF sigma factor FecI of *Escherichia coli* and is inhibited by RsiX. *Mol. Gen. Genet.* 256, 416–425.
- Camp, A.H., and Losick, R. (2009). A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 23, 1014–1024.
- Camp, A.H., Wang, A.F., and Losick, R. (2011). A Small Protein Required for the Switch from σ^F to σ^G during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 193, 116–124.

- Cao, M., Wang, T., Ye, R., and Helmann, J.D. (2002). Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* σ^W and σ^M regulons. *Mol. Microbiol.* *45*, 1267–1276.
- Cao, M., Salzberg, L., Tsai, C.S., Mascher, T., Bonilla, C., Wang, T., Ye, R.W., Marquez-Magana, L., and Helmann, J.D. (2003). Regulation of the *Bacillus subtilis* Extracytoplasmic Function Protein Y and Its Target Promoters. *J. Bacteriol.* *185*, 4883–4890.
- Carniol, K., Eichenberger, P., and Losick, R. (2004). A Threshold Mechanism Governing Activation of the Developmental Regulatory Protein σ^F in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* *279*, 14860–14870.
- Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A., and Gross, C.A. (2007). Design principles of the proteolytic cascade governing the σ^E -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev.* *21*, 124–136.
- Chai, Y., Norman, T., Kolter, R., and Losick, R. (2010). An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* *24*, 754–765.
- Chang, B.Y., and Doi, R.H. (1990). Overproduction, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* RNA polymerase sigma A factor. *J. Bacteriol.* *172*, 3257–3263.
- Chary, V.K., Meloni, M., Hilbert, D.W., and Piggot, P.J. (2005). Control of the Expression and Compartmentalization of σ^G Activity during Sporulation of *Bacillus subtilis* by Regulators of σ^F and σ^E . *J. Bacteriol.* *187*, 6832–6840.
- Chary, V.K., Xenopoulos, P., and Piggot, P.J. (2007). Expression of the σ^F -Directed *csfB* Locus Prevents Premature Appearance of σ^G Activity during Sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *189*, 8754–8757.
- Chen, R., Guttenplan, S.B., Blair, K.M., and Kearns, D.B. (2009). Role of the σ^D -Dependent Autolysins in *Bacillus subtilis* Population Heterogeneity. *J. Bacteriol.* *191*, 5775–5784.
- Choi, S.-K., and Saier, M.H. (2005). Regulation of *sigL* Expression by the Catabolite Control Protein CcpA Involves a Roadblock Mechanism in *Bacillus subtilis*: Potential Connection between Carbon and Nitrogen Metabolism. *J. Bacteriol.* *187*, 6856–6861.
- Cozy, L.M., Phillips, A.M., Calvo, R.A., Bate, A.R., Hsueh, Y.-H., Bonneau, R., Eichenberger, P., and Kearns, D.B. (2012). *SlrA/SinR/SlrR* inhibits motility gene expression upstream of a hypersensitive and hysteretic switch at the level of σ^D in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *83*, 1210–1228.
- Débarbouillé, M., Martin-Verstraete, I., Kunst, F., and Rapoport, G. (1991). The *Bacillus subtilis* *sigL* gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 9092–9096.
- Débarbouillé, M., Gardan, R., Arnaud, M., and Rapoport, G. (1999). Role of BkdR, a Transcriptional Activator of the *SigL*-Dependent Isoleucine and Valine Degradation Pathway in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *181*, 2059–2066.
- Delumeau, O., Lewis, R.J., and Yudkin, M.D. (2002). Protein-Protein Interactions That Regulate the Energy Stress Activation of σ^B in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *184*, 5583–5589.

- Dufour, A., and Haldenwang, W.G. (1994). Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* 176, 1813–1820.
- Eiamphungporn, W., and Helmann, J.D. (2008). The *Bacillus subtilis* σ M regulon and its contribution to cell envelope stress responses: *Bacillus subtilis* σ M regulon. *Mol. Microbiol.* 67, 830–848.
- Eichenberger, P., Jensen, S.T., Conlon, E.M., van Ooij, C., Silvaggi, J., González-Pastor, J.-E., Fujita, M., Ben-Yehuda, S., Stragier, P., Liu, J.S., et al. (2003). The σ E Regulon and the Identification of Additional Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 327, 945–972.
- Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T., Liu, J.S., et al. (2004). The Program of Gene Transcription for a Single Differentiating Cell Type during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol* 2, e328.
- Ellermeier, C.D., and Losick, R. (2006). Evidence for a novel protease governing regulated intramembrane proteolysis and resistance to antimicrobial peptides in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 20, 1911–1922.
- Eymann, C., and Hecker, M. (2001). Induction of σ B-dependent general stress genes by amino acid starvation in a *spo0H* mutant of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 221–227.
- Fawcett, P., Melnikov, A., and Youngman, P. (1998). The *Bacillus* SpoIIIGA protein is targeted to sites of spore septum formation in a SpoIIIE-independent manner. *Mol. Microbiol.* 28, 931–943.
- Feucht, A., Abbotts, L., and Errington, J. (2002). The cell differentiation protein SpoIIIE contains a regulatory site that controls its phosphatase activity in response to asymmetric septation. *Mol. Microbiol.* 45, 1119–1130.
- Fujita, M., and Losick, R. (2003). The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes Dev.* 17, 1166–1174.
- Gaidenko, T.A., and Price, C.W. (2014). Genetic Evidence for a Phosphorylation-Independent Signal Transduction Mechanism within the *Bacillus subtilis* Stressosome. *PLoS ONE* 9, e90741.
- Gardan, R., Rapoport, G., and Débarbouillé, M. (1997). Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 24, 825–837.
- Gruber, T.M., Markov, D., Sharp, M.M., Young, B.A., Lu, C.Z., Zhong, H.J., Artsimovitch, I., Geszvain, K.M., Arthur, T.M., Burgess, R.R., et al. (2001). Binding of the Initiation Factor σ 70 to Core RNA Polymerase Is a Multistep Process. *Mol. Cell* 8, 21–31.
- Guariglia-Oropeza, V., and Helmann, J.D. (2011). *Bacillus subtilis* V Confers Lysozyme Resistance by Activation of Two Cell Wall Modification Pathways, Peptidoglycan O-Acetylation and D-Alanylation of Teichoic Acids. *J. Bacteriol.* 193, 6223–6232.
- Hastie, J.L., Williams, K.B., and Ellermeier, C.D. (2013). The Activity of σ V, an Extracytoplasmic Function σ Factor of *Bacillus subtilis*, Is Controlled by Regulated Proteolysis of the Anti- σ Factor RsiV. *J. Bacteriol.* 195, 3135–3144.

- Haugen, S.P., Ross, W., Manrique, M., and Gourse, R.L. (2008). Fine structure of the promoter- σ region 1.2 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 3292–3297.
- Heinrich, J., Hein, K., and Wiegert, T. (2009). Two proteolytic modules are involved in regulated intramembrane proteolysis of *Bacillus subtilis* RsiW. *Mol. Microbiol.* *74*, 1412–1426.
- Helmann, J.D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* *46*, 47–110.
- Ho, T.D., and Ellermeier, C.D. (2012). Extra cytoplasmic function σ factor activation. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 182–188.
- Ho, T.D., Hastie, J.L., Intile, P.J., and Ellermeier, C.D. (2011). The *Bacillus subtilis* Extracytoplasmic Function Factor V Is Induced by Lysozyme and Provides Resistance to Lysozyme. *J. Bacteriol.* *193*, 6215–6222.
- Hofmeister, A.E.M., Londono-Vallejo, A., Harry, E., Stragier, P., and Losick, R. (1995). Extracellular signal protein triggering the proteolytic activation of a developmental transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* *83*, 219–226.
- Holtmann, G., Brigulla, M., Steil, L., Schütz, A., Barnekow, K., Völker, U., and Bremer, E. (2004). RsbV-Independent Induction of the SigB-Dependent General Stress Regulon of *Bacillus subtilis* during Growth at High Temperature. *J. Bacteriol.* *186*, 6150–6158.
- Horsburgh, M.J., and Moir, A. (1999). σ_M , an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol. Microbiol.* *32*, 41–50.
- Hsueh, Y.-H., Cozy, L.M., Sham, L.-T., Calvo, R.A., Gutu, A.D., Winkler, M.E., and Kearns, D.B. (2011). DegU-phosphate activates expression of the anti-sigma factor FlgM in *Bacillus subtilis*: DegU activates FlgM expression. *Mol. Microbiol.* *81*, 1092–1108.
- Huang, W.-Z., Wang, J.-J., Chen, H.-J., Chen, J.-T., and Shaw, G.-C. (2013). The heat-inducible essential response regulator WalR positively regulates transcription of sigI, mreBH and lytE in *Bacillus subtilis* under heat stress. *Res. Microbiol.* *164*, 998–1008.
- Huang, X., Decatur, A., Sorokin, A., and Helmann, J.D. (1997). The *Bacillus subtilis* sigma(X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature. *J. Bacteriol.* *179*, 2915–2921.
- Jonas, R.M., Weaver, E.A., Kenney, T.J., Moran, C.P., and Haldenwang, W.G. (1988). The *Bacillus subtilis* spoIIG operon encodes both sigma E and a gene necessary for sigma E activation. *J. Bacteriol.* *170*, 507–511.
- Kalman, S., Duncan, M.L., Thomas, S.M., and Price, C.W. (1990). Similar organization of the sigB and spoIIA operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* *172*, 5575–5585.
- Kanehara, K., Ito, K., and Akiyama, Y. (2002). YaeL (EcfE) activates the σ_E pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- σ_E , RseA. *Genes Dev.* *16*, 2147–2155.

- Kearns, D.B., and Losick, R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 19, 3083–3094.
- Kingston, A.W., Subramanian, C., Rock, C.O., and Helmann, J.D. (2011). A σ^W -dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity: σ^W mediates homeoviscous adaptation. *Mol. Microbiol.* 81, 69–79.
- Krásný, L., and Gourse, R.L. (2004). An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J.* 23, 4473–4483.
- Krüger, E., Msadek, T., and Hecker, M. (1996). Alternate promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon. *Mol. Microbiol.* 20, 713–723.
- LaBell, T.L., Trempy, J.E., and Haldenwang, W.G. (1987). Sporulation-specific sigma factor sigma 29 of *Bacillus subtilis* is synthesized from a precursor protein, P31. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 1784–1788.
- Locke, J.C.W., Young, J.W., Fontes, M., Jimenez, M.J.H., and Elowitz, M.B. (2011). Stochastic Pulse Regulation in Bacterial Stress Response. *Science* 334, 366–369.
- Luo, Y., and Helmann, J.D. (2012). Analysis of the role of *Bacillus subtilis* σ^M in β -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis: Multiple roles of ECF σ factors in β -lactam resistance. *Mol. Microbiol.* 83, 623–639.
- MacLellan, S.R., Wecke, T., and Helmann, J.D. (2008). A previously unidentified sigma factor and two accessory proteins regulate oxalate decarboxylase expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 69, 954–967.
- MacLellan, S.R., Guariglia-Oropeza, V., Gaballa, A., and Helmann, J.D. (2009a). A two-subunit bacterial σ -factor activates transcription in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21323–21328.
- MacLellan, S.R., Helmann, J.D., and Antelmann, H. (2009b). The YvrI Alternative σ Factor Is Essential for Acid Stress Induction of Oxalate Decarboxylase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191, 931–939.
- Martin-Verstraete, I., Stülke, J., Klier, A., and Rapoport, G. (1995). Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J. Bacteriol.* 177, 6919–6927.
- Matsumoto, T., Nakanishi, K., Asai, K., and Sadaie, Y. (2005). Transcriptional analysis of the *ylaABCD* operon of *Bacillus subtilis* encoding a sigma factor of extracytoplasmic function family. *Genes Genet. Syst.* 80, 385–393.
- Maul, B., Völker, U., Riethdorf, S., Engelmann, S., and Hecker, M. (1995). Sigma B-dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 248, 114–120.
- Mendez, R., Gutierrez, A., Reyes, J., and Márquez-Magaña, L. (2012). The Extracytoplasmic Function Sigma Factor SigY Is Important for Efficient Maintenance of the Sp β Prophage That Encodes Sublancin in *Bacillus subtilis*. *DNA Cell Biol.* 31, 946–955.

- Mirel, D.B., and Chamberlin, M.J. (1989). The *Bacillus subtilis* flagellin gene (*hag*) is transcribed by the sigma 28 form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* *171*, 3095–3101.
- Morett, E., and Buck, M. (1989). In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* *nifH* promoters: The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.* *210*, 65–77.
- Murray, E.J., Strauch, M.A., and Stanley-Wall, N.R. (2009). σ^X Is Involved in Controlling *Bacillus subtilis* Biofilm Architecture through the *AbrB* Homologue *Abh*. *J. Bacteriol.* *191*, 6822–6832.
- Nannapaneni, P., Hertwig, F., Depke, M., Hecker, M., Mader, U., Volker, U., Steil, L., and van Hijum, S.A.F.T. (2012). Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology* *158*, 696–707.
- Perego, M., Spiegelman, G.B., and Hoch, J.A. (1988). Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *2*, 689–699.
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M.A., Leopold, K., and Fischer, W. (1995). Incorporation of D-Alanine into Lipoteichoic Acid and Wall Teichoic Acid in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* *270*, 15598–15606.
- Pooley, H.M., and Karamata, D. (2000). Incorporation of [2-3H]glycerol into cell surface components of *Bacillus subtilis* 168 and thermosensitive mutants affected in wall teichoic acid synthesis: effect of tunicamycin. *Microbiology* *146*, 797–805.
- Predich, M., Nair, G., and Smith, I. (1992). *Bacillus subtilis* early sporulation genes *kinA*, *spo0F*, and *spo0A* are transcribed by the RNA polymerase containing sigma H. *J. Bacteriol.* *174*, 2771–2778.
- Reder, A., Höper, D., Gerth, U., and Hecker, M. (2012a). Contributions of Individual σ^B -Dependent General Stress Genes to Oxidative Stress Resistance of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *194*, 3601–3610.
- Reder, A., Gerth, U., and Hecker, M. (2012b). Integration of σ^B Activity into the Decision-Making Process of Sporulation Initiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *194*, 1065–1074.
- Regan, G., Itaya, M., and Piggot, P.J. (2012). Coupling of σ^G Activation to Completion of Engulfment during Sporulation of *Bacillus subtilis* Survives Large Perturbations to DNA Translocation and Replication. *J. Bacteriol.* *194*, 6264–6271.
- Rudner, D.Z., and Losick, R. (2002). A sporulation membrane protein tethers the pro- σ^K processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localization. *Genes Dev.* *16*, 1007–1018.
- Ryu, H.-B., Shin, I., Yim, H.-S., and Kang, S.-O. (2006). YlaC is an extracytoplasmic function (ECF) sigma factor contributing to hydrogen peroxide resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Seoul Korea* *44*, 206–216.
- Salzberg, L.I., Powell, L., Hokamp, K., Botella, E., Noone, D., and Devine, K.M. (2013). The WalRK (YycFG) and σ^I RsgI regulators cooperate to control CwlO and LytE expression in exponentially growing and stressed *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Microbiol.* *87*, 180–195.

- Sato, T., Samori, Y., and Kobayashi, Y. (1990). The *cisA* cistron of *Bacillus subtilis* sporulation gene *spoIVC* encodes a protein homologous to a site-specific recombinase. *J. Bacteriol.* 172, 1092–1098.
- Schmidt, R., Margolis, P., Duncan, L., Coppolecchia, R., Moran, C.P., and Losick, R. (1990). Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 9221–9225.
- Schöbel, S., Zellmeier, S., Schumann, W., and Wiegert, T. (2004). The *Bacillus subtilis* σ^W anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol. Microbiol.* 52, 1091–1105.
- Serizawa, M., Yamamoto, H., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Sekiguchi, J. (2004). Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene* 329, 125–136.
- Sorokin, A., Bolotin, A., Purnelle, H., Hilbert, H., Lauber, J., Düsterhöft, A., and Ehrlich, S.D. (1997). Sequence of the *Bacillus subtilis* genome region in the vicinity of the *lev* operon reveals two new extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factors SigV and SigZ. *Microbiology* 143, 2939–2943.
- Stragier, P., Kunkel, B., Kroos, L., and Losick, R. (1989). Chromosomal Rearrangement Generating a Composite Gene for a Developmental Transcription Factor. *Science* 243, 507.
- Strauch, M.A. (1995). Delineation of AbrB-binding sites on the *Bacillus subtilis* *spo0H*, *kinB*, *ftsAZ*, and *pbpE* promoters and use of a derived homology to identify a previously unsuspected binding site in the *bsuB1* methylase promote. *J. Bacteriol.* 177, 6999–7002.
- Thackray, P.D., and Moir, A. (2003). SigM, an Extracytoplasmic Function Sigma Factor of *Bacillus subtilis*, Is Activated in Response to Cell Wall Antibiotics, Ethanol, Heat, Acid, and Superoxide Stress. *J. Bacteriol.* 185, 3491–3498.
- Tojo, S., Matsunaga, M., Matsumoto, T., Kang, C.-M., Yamaguchi, H., Asai, K., Sadaie, Y., Yoshida, K., and Fujita, Y. (2003). Organization and Expression of the *Bacillus subtilis* sigY Operon. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 935–946.
- Tseng, C.-L., and Shaw, G.-C. (2008). Genetic Evidence for the Actin Homolog Gene *mreBH* and the Bacitracin Resistance Gene *bcrC* as Targets of the Alternative Sigma Factor SigI of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190, 1561–1567.
- Tseng, C.-L., Chen, J.-T., Lin, J.-H., Huang, W.-Z., and Shaw, G.-C. (2011). Genetic evidence for involvement of the alternative sigma factor SigI in controlling expression of the cell wall hydrolase gene *lytE* and contribution of LytE to heat survival of *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* 193, 677–685.
- Vijay, K., Brody, M.S., Fredlund, E., and Price, C.W. (2000). A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 35, 180–188.

- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., and Eichenberger, P. (2006). The Forespore Line of Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 358, 16–37.
- Weir, J., Predich, M., Dubnau, E., Nair, G., and Smith, I. (1991). Regulation of *spo0H*, a gene coding for the *Bacillus subtilis* sigma H factor. *J. Bacteriol.* 173, 521–529.
- West, J.T., Estacio, W., and Márquez-Magaña, L. (2000). Relative Roles of the *fla*/*chePA*, *PD-3*, and *P sigD* Promoters in Regulating Motility and *sigD* Expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182, 4841–4848.
- Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S., and Schumann, W. (2001). Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ W regulon. *Mol. Microbiol.* 41, 59–71.
- Wiegeshoff, F., Beckering, C.L., Debarbouille, M., and Marahiel, M.A. (2006). Sigma L is Important for Cold Shock Adaptation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 3130–3133.
- Wise, A.A., and Price, C.W. (1995). Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor sigma B in response to environmental signals. *J. Bacteriol.* 177, 123–133.
- Wu, L.J., and Errington, J. (2000). Identification and Characterization of a New Prespore-Specific Regulatory Gene, *rsfA*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182, 418–424.
- Yang, C.-K., Tai, P.C., and Lu, C.-D. (2014). Time-Related Transcriptome Analysis of *B. subtilis* 168 During Growth with Glucose. *Curr. Microbiol.* 68, 12–20.
- Yang, X., Kang, C.M., Brody, M.S., and Price, C.W. (1996). Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev.* 10, 2265–2275.
- York, K., Kenney, T.J., Satola, S., Moran, C.P., Poth, H., and Youngman, P. (1992). *Spo0A* controls the sigma A-dependent activation of *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription unit *spoIIIE*. *J. Bacteriol.* 174, 2648–2658.
- Yoshimura, M. (2004). Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology* 150, 591–599.
- Young, J.W., Locke, J.C.W., and Elowitz, M.B. (2013). Rate of environmental change determines stress response specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4140–4145.
- Yu, Y.-T.N., and Kroos, L. (2000). Evidence that *SpoIVFB* Is a Novel Type of Membrane Metalloprotease Governing Intercompartmental Communication during *Bacillus subtilis* Sporulation. *J. Bacteriol.* 182, 3305–3309.
- Zellmeier, S., Hofmann, C., Thomas, S., Wiegert, T., and Schumann, W. (2005). Identification of σ V-dependent genes of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 221–229.

- Zellmeier, S., Schumann, W., and Wiegert, T. (2006). Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* σ^W stress response. *Mol. Microbiol.* *61*, 1569–1582.
- Zhang, J., Ichikawa, H., Halberg, R., Kroos, L., and Aronson, A.I. (1994). Regulation of the Transcription of a Cluster of *Bacillus subtilis* Spore Coat Genes. *J. Mol. Biol.* *240*, 405–415.
- Zheng, L., Halberg, R., Roels, S., Ichikawa, H., Kroos, L., and Losick, R. (1992). Sporulation regulatory protein GerE from *Bacillus subtilis* binds to and can activate or repress transcription from promoters for mother-cell-specific genes. *J. Mol. Biol.* *226*, 1037–1050.
- Zhou, R., and Kroos, L. (2004). BofA protein inhibits intramembrane proteolysis of pro- σ^K in an intercompartmental signaling pathway during *Bacillus subtilis* sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6385–6390.
- Zhou, R., and Kroos, L. (2005). Serine proteases from two cell types target different components of a complex that governs regulated intramembrane proteolysis of pro- σ^K during *Bacillus subtilis* development. *Mol. Microbiol.* *58*, 835–846.
- Zhou, R., Cusumano, C., Sui, D., Garavito, R.M., and Kroos, L. (2009). Intramembrane proteolytic cleavage of a membrane-tethered transcription factor by a metalloprotease depends on ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 16174–16179.
- Zhou, R., Chen, K., Xiang, X., Gu, L., and Kroos, L. (2013). Features of Pro- σ^K Important for Cleavage by SpoIVFB, an Intramembrane Metalloprotease. *J. Bacteriol.* *195*, 2793–2806.
- Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J.R., Maurizi, M.R., and Wickner, S. (2001). The RssB response regulator directly targets ζ S for degradation by ClpXP. *Genes Dev.* *15*, 627–637.
- Zuber, U., Drzewiecki, K., and Hecker, M. (2001). Putative Sigma Factor SigI (YkoZ) of *Bacillus subtilis* Is Induced by Heat Shock. *J. Bacteriol.* *183*, 1472–1475.
- Zuberi, A.R., Ying, C.W., Weinreich, M.R., and Ordal, G.W. (1990). Transcriptional organization of a cloned chemotaxis locus of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *172*, 1870–1876.
- Zweers, J.C., Nicolas, P., Wiegert, T., van Dijl, J.M., and Denham, E.L. (2012). Definition of the σ^W Regulon of *Bacillus subtilis* in the Absence of Stress. *PLoS ONE* *7*, e48471.